

## MICROARRAYS OF POLYPEPTIDES

**Patent number:** JP2002542487T

**Publication date:** 2002-12-10

**Inventor:**

**Applicant:**

**Classification:**

- international: G01N33/53; G01N33/566; G01N37/00

- european: B01J19/00C; G01N33/68A10

**Application number:** JP20000612755T 20000414

**Priority number(s):** US19990129449P 19990415; WO2000US10171  
20000414

**Also published as:**

 WO0063701 (A3)

 WO0063701 (A3)

 WO0063701 (A2)

 EP1169649 (A3)

 EP1169649 (A3)

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2002542487T

Abstract of corresponding document: **WO0063701**

Microarrays of polypeptides on a solid support are provided. The microarray compositions find use in the multiplexed detection and quantitation of ligands, e.g. antigens or antibodies, in a miniaturized format. The substrate is used for detecting binding of ligands to a plurality of polypeptides for screening and diagnostic purposes.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表 2002-542487

(P 2002-542487 A)

(43) 公表日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51) Int. C l.<sup>7</sup>  
G 01 N 33/53

識別記号

F I  
G 01 N 33/53

テマコード(参考)  
M  
D

33/566  
37/00 102

33/566  
37/00 102

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全47頁)

(21) 出願番号 特願2000-612755(P2000-612755)  
(86) (22) 出願日 平成12年4月14日(2000.4.14)  
(85) 翻訳文提出日 平成13年10月10日(2001.10.10)  
(86) 國際出願番号 PCT/US00/10171  
(87) 國際公開番号 WO00/63701  
(87) 國際公開日 平成12年10月26日(2000.10.26)  
(31) 優先権主張番号 60/129,449  
(32) 優先日 平成11年4月15日(1999.4.15)  
(33) 優先権主張國 米国(U.S.)  
(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, C Y,  
D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I  
T, L U, M C, N L, P T, S E), C A, J P, U  
S

(71) 出願人 ザ、ボード、オブ、トラスティーズ、オブ、  
ザ、リーランド、スタンフォード、ジュニ  
ア、ユニバーシティ  
THE BOARD OF TRUSTE  
ES OF THE LELAND ST  
ANFORD JUNIOR UNIVE  
RSITY  
アメリカ合衆国、94304、カリフォルニア  
州、パロアルト、ストート 350、ウェルチ  
ロード 900  
(74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ポリペプチドのマイクロアレイ

(57) 【要約】

固体支持体上のポリペプチドのマイクロアレイが提供さ  
れる。マイクロアレイの組成物は、微小化した形式での  
リガンド、例えば、抗原または抗体の、重複した検出お  
よび定量に使用される。基板は、スクリーニングおよび  
診断の目的で、複数のポリペプチドへのリガンドの結合  
を検出するために使用される。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 二次元の固体支持体1cm<sup>2</sup>あたり100またはそれ以上の互いに異なるポリペプチド鎖の不連続な領域を含む、ポリペプチドのマイクロアレイにサンプルを接触させる段階；  
該支持体から結合しなかったサンプルを洗い流す段階；および  
結合したリガンドの存在を検出する段階  
を含む、サンプル中の複数のタンパク質結合リガンドの存在を同時に検出する方法。

【請求項2】 サンプル中に存在するリガンドが、検出可能な標識で標識されている、請求項1記載の方法。

【請求項3】 検出可能な標識が蛍光色素である、請求項2記載の方法。

【請求項4】 第2の検出可能な標識で標識されたリガンドを含む第2のサンプルをマイクロアレイに接触させる段階をさらに含む、請求項2記載の方法。

【請求項5】 第2の検出可能な標識が蛍光色素である、請求項4記載の方法。

【請求項6】 サンプルが体液の臨床サンプルである、請求項1記載の方法

。

【請求項7】 体液が血液またはその派生物である、請求項6記載の方法。

【請求項8】 サンプルが細胞培養上清である、請求項1記載の方法。

【請求項9】 サンプルが細胞溶解物である、請求項1記載の方法。

【請求項10】 ポリペプチドが抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項11】 ポリペプチドが抗原である、請求項1記載の方法。

【請求項12】 ポリペプチドが少なくとも50アミノ酸の長さである、請求項1記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****発明の分野**

本発明は生体サンプルのマイクロアレイを作製する方法および装置、ならびにその利用に関する。

**【0002】****発明の背景**

全ての生物体の生命および発生は、例えば、DNAとタンパク質、タンパク質とタンパク質、またはタンパク質と小分子のような、分子間相互作用によって決定する。これらの中でも、タンパク質-タンパク質相互作用は、例えば、抗体と抗原、受容体とペプチドホルモンまたはタンパク質ホルモン、酵素と基質または阻害剤の間の相互作用のように、特に重要な役割を果たす。最も良く売れる薬剤の多くは、タンパク質を標的として作用するか、それ自身がタンパク質であるかのいずれかである。また、診断の基礎となる疾病的分子マーカーの多くも、タンパク質である。

**【0003】**

ハイスループットのタンパク質分析の技術および試薬の開発は、非常に興味を持たれてきた。特に、対象となる生物体のDNA配列に関する知識が増加したため、タンパク質の発現解析への興味が高まった。ヒトのゲノムを理解し、組織化するため、プロテオミクスがいかに重要かという認識が急速に高まっている。細胞中に存在するタンパク質全量に関する情報は、医学的に重要なタンパク質およびそれが由来する遺伝子の発見を加速するための鍵となる。

**【0004】**

遺伝学は、遺伝子活性および特定の疾病の間の関係を確立する。しかし、疾病の経過の大部分は、遺伝子レベルではなく、タンパク質レベルで現れる。種々の遺伝子活性のレベルと、対応するタンパク質の相対的な量との間には、あまり相関関係がないことが多い。また、タンパク質とタンパク質の翻訳後修飾は、同一の遺伝子によって直接コードされておらず、したがって個々のタンパク質の完全な構造は、遺伝子のみを参照していくは決定できない。

**【0005】**

タンパク質の結合に注目したアッセイ法を利用して、タンパク質の発現の定量；特異的相互作用の決定；タンパク質のリガンドの存在の決定などを行うことができる。関係する抗体への結合を決定することによってサンプル中のタンパク質を定量する方法は、当技術分野で周知である。

**【0006】**

例えば、血清サンプルにおける抗原または抗体の固相ラジオイムノアッセイ法(RIA)は、周知である。キャット(Catt)らはプラスチックチューブ(米国特許第3,646,346号)およびプラスチックディスク(J. Lab. & Clin. Med., 70:820(1967))の表面におけるそのような技術を報告した。そのような技術では、まず過剰量の特異的抗体を支持体の表面に吸着させる。その後、サンドイッチまたは競合結合技術では、検定するサンプルをその表面と免疫学的に反応させる。米国特許第3,555,143号に説明される競合結合技術では、濃度を決定する抗原および既知量の放射標識した抗原を、抗体が吸着した表面に免疫学的に反応させる。その後、表面上の抗体に結合した標識抗原を定量して、元のサンプル中の抗原の総量を間接的に決定する。サンドイッチ技術では、未知の濃度の抗原を含む血清を、抗体を含む表面に免疫学的に反応させる。次の段階では、結合した抗原を標識抗体とインキュベートして、免疫学的に結合した標識抗体の量を測定する。

**【0007】**

ハイスループットの平行したタンパク質分析システムの開発は、特に、少量の物質の分析に使用できる場合に、非常に興味深い。好ましくは、そのようなシステムは、抗体、タンパク質受容体等のような、リガンドに高い結合親和性を持つ複雑な分子に使用できる。

**【0008】****参考文献**

対象となる文献には以下のものが含まれる：

Abouzied, et al., *Journal of AOAC International* 77(2):495-500 (1994). Bohlander, et al., *Genomics* 13:1322-1324 (1992). Drmanac, et al., *Science* 260:1649-1652 (1993). Fodor, et al., *Science* 251:767-773 (1991). Khrapko, et al., *DNA Sequence* 1:375-388 (1991). Kuriyama, et al., *An Isefet Biosensor, Applied Biosensors* (Donald Wise, Ed.), Butterworths, pp. 93-114 (1989). Lehrach, et al., *Hybridization Fingerprinting in Genome Mapping And Sequencing, Genome Analysis, Vol 1* (Davies and Tilgham, Eds.), Cold Spring Harbor Press, pp. 39-81 (1990). Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1989). Nelson, et al., *Nature Genetics* 4:11-18 (1993). Pimung, et al., U.S. Pat. No. 5,143,854 (1992). Riles, et al., *Genetics* 134:81-150 (1993). Schena, M. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:3894-3898 (1992). Southern, et al., *Genomics* 13:1008-1017 (1992).

### 【0009】

#### 発明の概要

アレイの各領域が既知量の選択された分析物特異的試薬を含む、固体支持体上の分析物アッセイ領域のマイクロアレイを作製する方法が提供される。本方法は、(i) 間隔の空いた同一の広がりを持つ細長い構成要素によって形成され、(ii) ある量の試薬溶液を保持するように適合され、および(iii) チャネル中の水溶液がメニスカスを形成するような先端領域を持つ、細長い毛細管チャネルを持つ試薬分配装置中に、選択された分析物特異的試薬の溶液をまず装填することを含む。好ましくは、チャネルは間隔の空いた先細りの構成要素の対によって形成される。マイクロアレイの組成物は、例えば、抗原または抗体のようなリガンドの、小型化した形での多様な検出と定量に利用できる。

### 【0010】

別の局面では、本発明は、約1 cm<sup>2</sup>未満の表面積中に少なくとも10<sup>3</sup>の異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドバイオポリマーのマイクロアレイを表面に持つ基板を含む。各々の互いに異なるバイオポリマーは、該アレイ中で別々の規定された位置に配置され、少なくとも50サブユニットの長さを持ち、約0.1フェムトモルから100ナノモルの間の規定された量である。

### 【0011】

基板は複数の配列の固定されたバイオポリマーに対するリガンドの結合を検出するために使用できる。1つの局面では、基板にはガラスの支持体、そのような支持体表面のポリリジンのようなポリカチオンポリマーのコート、および該コ-

トに非共有結合で静電気的に結合した互いに異なるバイオポリマーのアレイが含まれ、各々の互いに異なるバイオポリマーは表面アレイにおいて別々の規定された位置に配置されている。

### 【0012】

#### 発明の詳細な説明

アレイの各領域が既知量の選択されたポリペプチドを含む、固体支持体上でポリペプチド領域のマイクロアレイを作製する方法と組成物が提供される。例えばポリリジンのようなポリペプチドに結合する、誘導化された二次元表面基板へ微小量のタンパク質溶液を配置するためには、ロボットプリンターが使用される。表面にマイクロアレイを持つ基板には、約1 cm<sup>2</sup>未満の表面積に通常は少なくとも10<sup>3</sup>の異なるポリペプチドという高密度でスポットがつけられる。各異なるポリペプチドは、約0.1フェムトモルから100ナノモルの間の規定量で存在する。一般的にはポリペプチドは少なくとも50アミノ酸の長さを持つが、任意のポリペプチドを使用できる。

### 【0013】

マイクロアレイは、タンパク質、またはポリヌクレオチド、ホルモン、ビタミン、およびその他のコファクター等のようなタンパク質と相互作用する化合物の検出と定量のための定量方法および分析方法に、広く使用されている。通常は、マイクロアレイ上に固定したポリペプチドと結合すると考えられるリガンドを含むサンプルを、ポリペプチドとリガンドの間の特異的結合が許容されるような条件下で、マイクロアレイに添加する。結合しなかったサンプルはマイクロアレイから洗い流され、結合したリガンドは、例えばリガンド上に存在する検出可能な標識、または第2の検出段階で提供される適切な方法によって、検出される。本発明は高度に平行して微小化しているため、従来のイムノアッセイ法よりもサンプルの消費ははるかに少ない。多くの成分を平行して定量測定するために、単にいくつかのパラメータではなく、発現の多次元的パターンに基づいて、サンプルの生理的および表現型の特性を診断および認識することができる。

### 【0014】

本発明の1つの態様では、マイクロアレイへ結合したリガンドの存在のモニタ

一に、比較蛍光が使用される。比較蛍光測定を用いると、結合したリガンドの絶対量を測定する方法と比較して、広範囲のリガンド濃度および結合親和性に渡って、より精密に測定を行うことができる。

#### 【0015】

本発明の1つの態様では、バイオポリマーは、ポリペプチドの3次元構造によって機能的な結合特性が得られるポリペプチド、例えば、抗原、抗体、受容体等であり、その構造は、システイン残基の間のジスルフィド結合、疎水性ポケットなどのような隣接しないアミノ酸残基の間の接触にしばしば依存している。そのような結合特性には、生体系内で特異的な相互作用を提供する種々のタンパク質およびポリペプチド分子を含め、タンパク質受容体と1つまたはそれ以上の天然に存在するリガンド、例えば、サイトカインとサイトカイン受容体、ホルモンとホルモン受容体、ケモカインとケモカイン受容体等の間の特異的結合が含まれる。例えば核ホルモン受容体、転写因子等のようなDNA結合タンパク質も、関係するDNAモチーフを特異的に規定する能力をタンパク質が保持したマイクロアレイ上で提供できる。抗原特異的な免疫受容体の結合特性を保持したマイクロアレイは特に興味深く、その受容体には、抗体、T細胞抗原受容体、および主要組織適合性複合体タンパク質が含まれる。

#### 【0016】

本発明のこれらおよび他の対象および特徴は、添付の図面と組み合せて以下の本発明の詳細な説明を読むことによりさらに明らかになると思われる。

#### 【0017】

##### 定義

特に記載がないかぎり、以下に定義される用語は次のような意味を持つ。

#### 【0018】

「リガンド」とは、リガンド/抗リガンド結合対の1つの要素を意味する。例えば、リガンドは相補的なハイブリダイズした2本鎖核酸結合対の核酸鎖のうちの1本；エフェクター/受容体結合対におけるエフェクター分子；または抗原/抗体もしくは抗原/抗体断片の結合対における抗原であってもよい。

#### 【0019】

「抗リガンド」とは、リガンド/抗リガンド結合対の逆側の要素を意味する。

抗リガンドは、それぞれ、相補的なハイブリダイズした2本鎖核酸結合対の核酸鎖のうちの残りの1本；エフェクター/受容体結合対における受容体分子；または抗原/抗体もしくは抗原/抗体断片の結合対における抗体もしくは抗体断片であってよい。

#### 【0020】

「分析物」または「分析物分子」とは、その存在、量、および/または性質を決定すべきポリヌクレオチドまたはポリペプチドのような分子、通常は巨大分子を意味する。分析物はリガンド/抗リガンド対の1つの要素である。

#### 【0021】

「分析物特異的アッセイ試薬」とは、分析物分子に特異的に結合する効力のある分子を意味する。試薬は、リガンド/抗リガンド結合対の逆側の要素である。

#### 【0022】

「固体支持体上の領域のアレイ」とは、それが固体支持体の表面上に形成された限定された領域を持つ、好ましくは不連続の領域の直線状または2次元のアレイである。

#### 【0023】

「マイクロアレイ」とは、少なくとも約 $100/\text{cm}^2$ 、および好ましくは少なくとも約 $1000/\text{cm}^2$ の不連続な領域の密度を持つ領域のアレイである。マイクロアレイ中の領域は、通常は例えば直径で約 $10\sim250\mu\text{m}$ の間の範囲の寸法を持ち、ほぼ同じ距離によってアレイ上の他の領域から分離している。

#### 【0024】

表面に添加した水性媒体の小滴が、実質的に添加した小滴のサイズを越えて広がらなければ、支持体表面は「疎水性」である。すなわち、表面は、小滴との疎水性相互作用によって、表面に加えられた小滴が広がることを予防する。

#### 【0025】

「メニスカス」とは、液体の表面張力の結果として、チャネル中の液体の底に形成される凹表面または凸表面を意味する。

#### 【0026】

マイクロアレイを形成するバイオポリマーに用いられる「互いに異なるバイオポリマー」とは、異なるバイオポリマー配列、および/または、同一もしくは互いに異なるバイオポリマーの異なる濃度、および/または、別個もしくは異なる濃度でのバイオポリマーの異なる混合物という意味であり、他のアレイ要素とは異なるアレイ要素を意味する。したがって、「互いに異なるポリヌクレオチド」のアレイは、その要素として (i) 各要素ごと、ある規定量存在する場合がある、互いに異なるポリヌクレオチド、(ii) 所定の配列のポリヌクレオチドの異なる段階的な濃度、および/または (iii) 2つまたはそれ以上の互いに異なるポリヌクレオチドの異なる組成の混合物を含むアレイを意味する。

### 【0027】

「細胞のタイプ」とは、例えば、組織または器官または特定の分化状態の細胞、または特定の病理もしくは遺伝子構成を伴う細胞のような、特定の出所に由来する細胞を意味する。

### 【0028】

#### マイクロアレイの作製方法

このセクションでは、アレイ上の各領域が既知の量の選択された分析物特異的試薬を含む、固体支持体または基板上の分析物アッセイ領域のマイクロアレイの作製方法を説明する。

### 【0029】

図1は、本方法の実施に有用な試薬分配装置10の部分的模式図を示す。一般に、この装置は、以下に説明するように、16で示すようなある量の試薬溶液を保持するように適合した細長い開いた毛細管チャネル14を持つ試薬ディスペンサー12を含む。毛細管チャネルは、互いに向かって先細りになっておりチャネルの下端の先端または先端領域18で収束する、1対の間隔の空いた同一の広がりを持つ細長い要素12a、12bによって、形成される。さらに一般的には、開いたチャネルは、ある量の試薬溶液を保持するように適合し、図2Aの20に描かれるような凹面のメニスカスのようなメニスカスを形成するチャネル中の水性溶液に先端領域を持つ、少なくとも2つの間隔の空いた細長い要素によって形成される。ディスペンサーが開いたチャネルの構造を持つ利点は、以下に論じられている。

**【0030】**

さらに図1について、ディスペンサー装置は、以下に図2A～2Cについて説明するように、ディスペンサー中の既知量の溶液を支持体上に配置するために、支持体表面に向かう方向、およびこれから離れる方向に素早くディスペンサーを移動するための構造も含む。図示されている態様では、この構造には、ソレノイドピストン24を素早く下向きに引き、例えば、ばねのバイアスで、ピストンを示されるような通常の上がった位置に放出するように活性化できるソレノイド22が含まれる。ディスペンサーは、示されるように接続要素26によって、ピストンで運ばれる。上述の移動構造は、本明細書では、支持体上に既知量の液体を分配するために、ディスペンサーを移動して固体支持体にかみ合わせる分配手段とも呼ばれる。

**【0031】**

上述のディスペンサー装置は、以下に説明するように、選択した配置位置にディスペンサーを置くために、線上またはx-y平面上で移動できるアーム28によって運ばれる。

**【0032】**

図2A～2Cは、30に示す支持体のような固体支持体の表面上に、上述のディスペンサー中の既知量の試薬溶液を配置する方法を示す。支持体は、31に示される表面を持つポリマー、ガラス、または他の固体材料支持体である。

**【0033】**

1つの一般的な態様では、表面は、自然の、結合した、または共有結合した荷電基を持つ表面のように、比較的親水性、すなわち、ぬらすことのできる表面である。以下に説明する1つのそのような表面は、ポリシリジンのようなポリカチオンポリマーの吸着層を持つガラス表面である。

**【0034】**

別の態様では、表面は比較的疎水性の特性を持つ、または持つように作製されている。すなわち、表面に配置した水性媒質が玉になる。ポリスチレン、ポリプロピレン、またはポリエチレンのような種々の既知の疎水性ポリマーが望ましい疎水性の性質を持ち、支持体表面に塗布できる種々の潤滑剤または他の疎水性フ

イルム、およびガラスもそのような性質を持つ。

#### 【0035】

まず、ディスペンサーの先端を洗った後に試薬溶液に浸し、毛細管流動によつてディスペンサーチャネルへ充填されることなどにより、ディスペンサーに選択された分析物特異的試薬溶液を装填する。次に、支持体表面に対して選択された位置にディスペンサーを移動し、試薬を配置しようとする支持体表面位置の真上にディスペンサーの先端を位置させる。この動きは、図2Aに示されるように、ディスペンサーの先端が上がった位置にある状態で行われ、通常は、先端は基板の表面の少なくとも1~5 mm上にある。

#### 【0036】

ディスペンサーの位置をこのように定め、ソレノイド22を活性化してディスペンサーの先端が基板表面に向かう方向、およびこれから離れる方向に素早く移動させ、表面と瞬間的な接触をさせ、結果的にディスペンサーの先端が支持体表面を軽く叩くようとする。先端が表面を軽く叩く動きのために、チャネル先端の液体のメニスカスが破壊され、先端の液体が支持体表面に接触することになる。これにより、液体が先端と表面の間の毛管状の空間に液体が流れることになり、図2Bに示されるようにディスペンサーチャネルから液体が引き出される。

#### 【0037】

図2Cは、この場合は疎水性表面である支持体表面への先端からの液体の流れを示す。この図は、液体はディスペンサーから支持体表面に流れ続け、液体の玉32を形成することを示す。特定の玉のサイズ、すなわち容積で、液体が表面に流れ出る傾向は、表面上の玉の総面積を制限するように働く、支持体表面と玉との疎水性表面相互作用、および特定の玉の曲率に向かう小滴の表面張力と釣り合う。この時点で、特定の玉の容積が形成され、ディスペンサーが引き抜かれる際にディスペンサー先端が玉に接触し続けても、玉の容積にはほとんどまたは全く影響がない。

#### 【0038】

より親水性の表面における液体の配置では、液体は玉を形成する傾向が弱く、配置される容積は、例えば図2Bおよび図2Cに示されるように、ディスペンサー先

端が支持体表面の近接部分へ浸る総時間の影響を受けやすい。

### 【0039】

この方法で形成される所望の配置容積、すなわち玉の容積は、好ましくは2 pl (ピコリットル) から2 nl (ナノリットル) の範囲であるが、100 nlまたはそれ以上の容積を配置することもできる。選択された配置容積は、(i) ディスペンサー先端の面積、すなわち先端が広がる部分のサイズ、(ii) 支持体表面の疎水性、および(iii) 支持体表面との接触時間および先端が引き下がる速度に依存することが分かる。さらに、媒質の粘性を増加させ、結果的にディスペンサーから支持体表面への液体の流出時間を短縮すると、玉のサイズは小さくなる。支持体表面の疎水性グリッドパターンに取り囲まれる親水性領域中に小滴を配置することによって、玉のサイズをさらに制限できる。

### 【0040】

代表的な態様では、ディスペンサーの先端は支持体表面を素早く軽くたたき、支持体と接触する滞留時間は約1ミリ秒未満で、表面から上方に向かう移動速度は約10cm/秒である。

### 【0041】

表面に接触して形成される玉が、図2Cに示されるようにディスペンサー先端の幅とほぼ等しい直径を持つ半球体だと仮定すると、ディスペンサー先端の幅(d)に対して形成される玉の容積は、以下の表1のようになる。表にあるように、幅が約20から200 μmに増加するにつれて、玉の容積は2 plから2 nlとなる。

### 【0042】

【表1】

d	容積 (nl)
20 μm	$2 \times 10^{-3}$
50 μm	$3.1 \times 10^{-2}$
100 μm	$2.5 \times 10^{-1}$
200 μ	2

### 【0043】

1つの先端のサイズでは、表面の疎水性の増加、先端が表面と接触する時間の

減少、先端が表面から離れる速度の増加、および/または媒質の粘性の増加によって、玉の容積を制御しながら低下させることができる。これらのパラメータが固定されたら、望ましいplからnlの範囲において選択された容積の配置が、再現的に実行できる。

#### 【0044】

支持体の1つの選択された位置に玉を配置した後、通常は先端は第2の支持体上の対応する位置に移動し、その位置で小滴が配置され、複数の支持体の各々で選択された位置に試薬の小滴が配置されるまで、このプロセスが繰り返される。

#### 【0045】

その後、先端を洗浄して試薬溶液を除去し、別の試薬溶液で充填し、この試薬は各支持体上の別のアレイ位置に配置されることになる。1つの態様では、先端は、(i) 装置の毛細管チャネルを洗浄溶液に浸す、(ii) 毛細管チャネルに吸い込まれた洗浄溶液を除去する、および(iii) 毛細管チャネルを新しい試薬溶液に浸す、という段階によって洗浄および再充填される。

#### 【0046】

上述より、ピンセット様の開いた毛細管ディスペンサーの先端には、(i) 先端が開いたチャネルであるために、先端に新しい試薬を装填する前に迅速に効率良く洗浄および乾燥ができる、(ii) 受動的な毛細管現象によって標準的なマイクロウェルプレートから直接サンプルを充填できる一方で、数多くのアレイのプリントのための十分なサンプルを、開いた毛細管容器に保持できる、(iii) 開いた毛細管は閉じた毛細管よりも詰まりにくい、および(iv) 開いた毛細管は液体の送達のために完璧に仕上げた底の表面を必要としない、という利点があることが分かる。

#### 【0047】

上述の方法にしたがって固体支持体40の表面38上に形成されたマイクロアレイ36の一部が図3に示されている。このアレイは、領域42のような複数の分析物特異的試薬領域から構成されており、各領域には異なる分析物特異的試薬が含まれている可能性がある。上記のように、各領域の直径は、好ましくは約20~200 $\mu\text{m}$ の範囲である。各領域と最も近い（斜めではない）隣の領域との間隔は、中心間

で測定すると(44に示される)好ましくは約20~400μmの範囲である。したがって、例えば中心間の間隔が約250μmのアレイには、40領域/cmすなわち1,600領域/cm<sup>2</sup>が含まれている。アレイの形成後、支持体を処理して各領域を形成する小滴の液体を蒸発させることで処理し、乾燥した比較的平らな領域の望ましいアレイが残るようにする。この乾燥は、加熱または減圧下で行うことができる。

#### 【0048】

場合によっては、分析物試薬を含む小滴の水分をまず水で戻し、固体支持体への吸着時間を長くすることが望ましい場合もある。湿気のある環境で分析物試薬のスポットを行い、アレイ作製が完了するまで小滴が乾かないようにすることもできる。

#### 【0049】

##### アレイ形成のための自動器具

別の局面では、本発明は固体支持体上に分析物アッセイ領域のアレイを作製するための自動化器具を含むが、このアレイ中の各領域には既知量の選択された分析物特異的試薬が含まれる。

#### 【0050】

本器具は図4に二次元の部分的模式図として示されている。器具のディスペンサー装置72は、図1に関して上記に説明するような基本的な構造を持ち、実質的に図1および図2A~2Cに示すような先端で終結する開いた毛細管チャネルを持つディスペンサー74を含む。

#### 【0051】

ディスペンサーは配置位置に向かう方向と離れる方向に移動するための装置に取り付けられており、配置位置ではディスペンサーの先端が支持体表面を軽くたたき、上述のように選択された容積の試薬溶液を配置する。この動きは、上述のようにソレノイド76によって行われる。ソレノイド76は、コントロールユニット77の制御を受けており、その働きは以下に説明されている。本明細書では、ソレノイドは、支持体に対して規定のアレイ位置に装置が位置しているときに、ディスペンサーを移動して支持体にかみ合わせる分配手段とも呼ばれる。

#### 【0052】

ディスペンサー装置は、やはりユニット77の制御下にあるステッパーモーター-82によって望ましい方向に駆動（回転）するウォームスクリュー80上に、ねじ山によって取り付けられているアーム74によって運ばれる。図のスクリュー80の左端は、スクリュー軸に対する回転のためにスリーブ84中に収容されている。スクリューの逆の端は、ステッパーモーターのドライブシャフトに取り付けられており、これはスリーブ86に収納されている。ディスペンサー装置、ウォームスクリュー、ウォームスクリューを取り付けている2つのスリーブ、および図のx（水平）方向に装置を移動するために使われるステッパーモーターは、本明細書では合わせて転置アセンブリー86と呼ぶものを形成する。

#### 【0053】

転置アセンブリーは、スクリューの方向、すなわち図のx軸にそって、精密で微小な動きをするために作製されている。1つのモードでは、アセンブリーは5~25 $\mu\text{m}$ の範囲の選択された距離でx軸方向に移動するように機能する。別のモードでは、ディスペンサユニットは以下に説明するように、隣接した支持体上の関連する位置にディスペンサーを設置するように、数ミクロンまたはそれ以上の距離でx軸方向に精密に移動することができる。

#### 【0054】

転置アセンブリーは、選択されたy軸位置にディスペンサーを設置するために、その結果として図の「y」（垂直）軸方向に、取り付けられている。このアセンブリーを取り付けている構造には、1対のフレームバー90、92の間に固定して取り付けられた固定ロッド88、および1対のフレームバー96、98の間に回転できるように取り付けられたウォームスクリュー94が含まれる。このウォームスクリューは、ユニット77の制御下で作動するステッパーモーター100によって駆動（回転）する。モーターは、図に示すようにバー96に取り付けられている。

#### 【0055】

ウォームスクリュー94およびモーター100を含め、上述の構造は、スクリューの方向、すなわち図のy軸方向に、精密な微小な動きをするように作製されている。上述のように、1つのモードではこの構造は5~250 $\mu\text{m}$ の範囲の選択された距離でy軸方向で移動するように機能し、第2のモードでは、隣接した支持体上の

関連する位置にディスペンサーを設置するように、数ミクロンまたはそれ以上の距離でy軸方向に精密に移動することができる。

#### 【0056】

本明細書では、転置アセンブリーおよびこのアセンブリーをy軸方向に移動する構造は合わせて、支持体に関して選択されたアレイ位置にディスペンサー装置を設置するための位置決定手段と呼ぶ。

#### 【0057】

器具中のホルダー102は、器具によって試薬領域のマイクロアレイが形成されようとしている支持体104のような支持体を、複数保持することができる。ホルダーには、スロット106のようないくつかのへこんだスロットが提供されており、このスロットは支持体を受け、ディスペンサーの移動手段が取り付けられているフレームバーに対して選択された精密な位置に支持体を設置する。

#### 【0058】

上述のように、複数の支持体の各々の上で試薬領域の選択されたマイクロアレイを形成する器具を自動的に作動するための一続きの手順において、装置のコントロールユニットは、2つのステッパーモーターおよびディスペンサーソレノイドを作動させるように機能する。

#### 【0059】

コントロールユニットは、従来のマイクロプロセッサーコントロールの原理にしたがって、一定の时限の連續および適切なシグナル時間において、各ソレノイドおよび各ステッパーモーターに適切なシグナルを提供するように作製されている。ユニットの作製、および望ましいアレイパターンを得るためにユーザーが選択する設定は、代表的な器具の操作に関する以下の説明から理解できると思われる。

#### 【0060】

まず、ホルダーの1つまたは複数のスロットに1つまたは複数の支持体を設置する。その後、支持体上に配置する第1の試薬溶液を含むウェル（図には示さず）の真上の位置にディスペンサーを移動する。ここでディスペンサーソレノイドを発動させて、ディスペンサーの先端をこのウェル中まで下げ、ディスペンサーの

毛細管チャネルを充填させる。ここでモーター82、100を発動させ、第1の支持体の選択されたアレイ位置にディスペンサーを移動する。ディスペンサーのソレノイド作動によって、この位置でその試薬の選択された体積の小滴が配置される。上述のように、この操作によって好ましくは2 plから2 nlの間の選択された体積の試薬溶液が配置される。

#### 【0061】

ここでディスペンサーを隣接する支持体の対応する位置に移動させ、この位置で同様な量の溶液が配置される。各支持体上のあらかじめ選択された対応する位置に試薬が配置されるまで、このプロセスが繰り返される。

#### 【0062】

1つの支持体上の2つ以上のアレイ位置に单一の試薬を配置することが望ましい場合には、ディスペンサーを新しい支持体に移動する前に、各支持体ごとで異なるアレイ位置に移動させるか、または1つの選択された位置で、各支持体上の個々の位置に溶液を配置した後、新しいアレイ位置ごとにこのサイクルを繰り返すことができる。

#### 【0063】

次の試薬を配置するためには、ディスペンサーを洗浄溶液（図には示さず）の上に移動し、試薬溶液が実質的に先端から洗い流されるまで、ディスペンサーの先端をこの溶液に出し入れする。浸すごとに、溶液を減圧、圧縮空気スプレー、スポンジなどによって溶液を除去することができる。

#### 【0064】

次にディスペンサーの先端を第2の試薬ウェルに浸し、充填した先端を第1の支持体の2番目の選択されたアレイ位置に移動する。その後、上述のように、対応する第2のアレイ位置の各々に試薬を配置するプロセスを行う。各支持体上の試薬溶液のマイクロアレイ全体が作製されるまで、このプロセスが繰り返される。

#### 【0065】

##### マイクロアレイ基板

本セクションでは、基板表面上に生体ポリマーのマイクロアレイが載っている基板の態様を説明し、特にポリカチオンポリマーでコートされたガラススライド

上に結合した互いに異なるポリペプチドのマイクロアレイについて説明する。

### 【0066】

基板は、本発明の別の局面にしたがって作製され、複数の互いに異なるバイオポリマーの1つまたはそれ以上に標識リガンドが結合するのを検出するために使用することが意図されている。1つの態様では、基板には、ポリリジンまたはポリアルギニンのような好ましくはカチオン性ポリペプチドであるポリカチオンポリマーのコートが表面に形成されているガラスの基板が含まれる。ポリカチオン性のコート上には、互いに異なるバイオポリマーが作製され、それぞれ既知の選択された領域に配置される。

### 【0067】

スライドの表面にポリカチオンポリマー、例えば、ポリLリジンの均一な厚みのフィルムを置き、フィルムを乾燥させて乾燥コートを作製することによって、スライドのコートができる。添加するポリカチオンポリマーの量は、少なくとも、ガラス表面にポリマーの単層を形成するために十分な量である。ポリマーフィルムは、ガラス表面上の負のシリル-OH基とポリマー上の荷電したアミン基との間の静電結合によって、表面に結合する。ポリLリジンでコートされたガラススライドは、例えば、シグマケミカル社 (Sigma Chemical Co.) (ミズーリ州セントルイス) から市販されている。

### 【0068】

適切なマイクロアレイ基板は、ガラスの化学的誘導化によっても作製できる。末端のSi上に適切な脱離基をもつシラン化合物は、ガラス表面に共有結合する。誘導化分子は、ガラス基板の表面に望ましい化学的性質を与えるように設計できる。そのような2価性試薬の例は、アミノプロピルトリ(エトキシ)シランで、これは分子のトリ(エトキシ)シラン部分でガラス表面と反応するが、分子のアミノ部分は自由のままである。ポリリジンでコートされたスライドと同様に、バイオポリマーの吸着には、末端アミノ基を持つ表面が適している。末端表面基の本体は、さらなる化学反応によって修飾できる。例えば、上述の例における末端アミンとグルタルアルデヒドとの反応で、末端アルデヒド基が生成する。マイクロアレイのスポット前に、望ましい反応性を得るために、シリネート(silyna

ted) ガラスにプロテインAまたはプロテインGを塗布するといったような、更なる修飾を行うこともできる。ポリペプチドに結合するその他の表面は、シュリーチャランドシェル (Schleicherand Schuell) から販売されているニトロセルロースコートのガラススライド、およびポリスチレンのようなタンパク質結合プラスチックである。

### 【0069】

スポットされたポリペプチドは、吸着または共有結合によって接着する可能性がある。吸着は、スポットされたポリペプチドとアレイ基板の間の静電気的、疎水性、ファン・デル・ワールス力、または水素結合の相互作用によって起きる。ポリペプチド溶液を、水性の環境で表面に塗布するだけで、ポリペプチドの吸着には十分である。共有結合は、化学的に活性化された表面にポリペプチドの官能基が反応することによって起きる。例えば、表面がアルデヒド基またはスクシンイミド基のような高度に反応性の求電子性の基によって活性化されていれば、非修飾ポリペプチドはリジン残基または末端アミンにあるようなアミン基で反応し、共有結合が形成される。

### 【0070】

マイクロアレイを作製するためには、セクションIIに記述されるように、ポリマーでコートされたスライド上に、規定量の互いに異なるバイオポリマーが配置される。サンプル中の標識リガンドが基板アレイ中の関係する結合パートナーに結合できるような条件下で、基板に水性サンプルが添加されると、基板の重要な特性にしたがって、配置されたバイオポリマーは、コートされたスライド表面に非共有結合で結合する。

### 【0071】

好ましい態様では、各マイクロアレイには、約 $1\text{ cm}^2$ 以下の表面積あたり、少なくとも $10^3$ の互いに異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドのバイオポリマーが含まれる。1つの態様では、マイクロアレイは約 $16\text{ mm}^2$ 中に400の領域、すなわち $2.5 \times 10^3$ 領域/ $\text{cm}^2$ を含む。また、ある好ましい態様では各マイクロアレイ領域中のバイオポリマーは、約0.1フェムトモルから100ナノモルの間の、定められた量で存在する（ポリヌクレオチドの場合）。上述のように、各領域がしつ

かりと規定された量の配置された物質で作られる、この種の高密度アレイを作製する能力は、セクションIIに説明されたマイクロアレイ形成方法にしたがって獲得できる。

#### 【0072】

また、ある好ましい態様では、バイオポリマーは少なくとも約50ユニット、例えば、アミノ酸、ヌクレオチドなどの長さを持ち、すなわち、種々のインサイチュー合成によって形成される高密度アレイよりも実質的に長いポリマーである。

#### 【0073】

ポリペプチドのバイオポリマーは、任意の供給源由来のポリペプチドを含むことができる。対象となるポリペプチドには、細胞または他の生体源から単離されたポリペプチド、合成ペプチドおよびコンビナトリアルライブラリーから選択されたペプチドを含む合成ポリペプチド、ならびに組み換え核酸から合成されたポリペプチド等が含まれる。1つの態様では、ポリペプチドはファージディスプレーライブラリーまたはクローンから単離される (Huseら、(1989) *Science*. 1989 246(4935):1275-81; Winterら、(1994) *Annu Rev Immunol.* 12:433-55; Clacksonら (1991)、*Nature* 352(6336); 624-8参照)。通常、アレイの各々の互いに異なる領域のポリペプチドは、実質的に純粹である。

#### 【0074】

##### マイクロアレイの使用

細胞全体、ペプチド、酵素、抗体、抗原、受容体、リガンド、リン脂質、ポリマー、薬品類調製物、または化学物質のアレイは、本発明に説明される方法によって、医学的診断、創薬、分子生物学、免疫および毒性学における大規模スクリーニングアッセイ用に作製できる。

#### 【0075】

本発明にしたがって調製された固定化ポリペプチドのマイクロアレイは、数多くの診断およびスクリーニングでの大規模結合アッセイ法に使用できる。多数のタンパク質のレベルの定量的な変動を多重に測定するために、数個から多数のタンパク質によって決定されるパターンの認識が可能になる。多くの生理的パラメーターおよび疾病特異的パターンを同時に評価できる。

**【0076】**

本発明の1つの態様には、生体サンプル中に存在するタンパク質の分離、同定、および解析が含まれる。例えば、疾病および対照サンプルを比較することによって、「疾病特異的タンパク質」の同定が可能になる。これらのタンパク質は、薬剤開発の標的、または疾病的分子マーカーとして用いることができる。

**【0077】**

ポリペプチドアレイを用いて、サンプル中のタンパク質の発現レベルをモニターすることができるが、そのようなサンプルには、対象となる組織の生検、培養細胞、微生物細胞群、および血液、血漿、リンパ液、滑液、脳脊髄液、細胞溶解物、培養上清、羊水を含む体液等、ならびにそれらの派生物が含まれる可能性がある。特に興味深いのは、血液およびその派生物、脳脊髄液、尿、唾液、リンパ液、滑液等を含む体液の臨床サンプルである。測定は定量的、半定量的、または定性的でありえる。アッセイ法が定量的または半定量的な場合、好ましくは、例えば、標識および非標識サンプル間、または異なる標識をしたサンプル間のような、競合型の形式を含む。

**【0078】**

固定化したポリペプチドのリガンドの存在を検出するアッセイ法は、以下のように実行できるが、本明細書に述べられた方法である必要はない。

**【0079】**

サンプル、その画分または一部を、結合したポリペプチドを含むマイクロアレイに添加する。サンプルには上述のような様々な体液または抽出物が含まれる可能性がある。好ましくは、既知の濃度の対照リガンドを含む一連の標準も、対照としてサンプルまたはその一部と平行してアッセイする。インキュベーション時間は、リガンド分子がポリペプチドに結合するために十分な時間とする。一般に約0.1~3時間が十分で、通常は1時間で十分である。

**【0080】**

インキュベーション後、不溶性の支持体から結合しなかった成分を洗い流す。一般に、洗浄媒体としては、通常は7~8の適切なpHの、希釀した非イオン性界面活性剤が使用される。サンプル中に存在し特異的に結合しなかったタンパク質を

完全に洗い流すために十分な量を用いて、1~6回洗浄すればよい。

### 【0081】

結合したリガンドの存在を検出するためには、種々の方法が使用できる。これらは、3つの一般的なグループに分類される。リガンド自身を検出可能な標識で標識し、結合した標識を直接的に測定できる。または、競合アッセイ法で、標識したサンプルを異なる標識、または非標識のサンプルと混合できる。さらに別の態様では、サンプル自身は標識せず、存在するリガンドの量を定量するために、第2段階の標識試薬を添加する。

### 【0082】

リガンド結合を直接測定できる標識の例には、<sup>3</sup>Hまたは<sup>125</sup>Iのような放射標識、蛍光剤、色素、ビーズ、化学発光剤、コロイド粒子などが含まれる。適切な蛍光色素は、当技術分野で周知であり、フルオレセインイソチオシアネット(FITC)；ローダミンおよびローダミン誘導体；テキサスレッド；フィコエリスリン；アロフィコシアニン；6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)；2',7'-ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)；6-6カルボキシ-X-ローダミン(ROX)；6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)；5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM)；N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)；スルホン化ローダミン；Cy3；Cy5などが含まれる。好ましくは標識される化合物は、リガンドに存在する基、例えば、アミン基、チオール基、アルデヒド基などと反応する活性化色素と混合される。

### 【0083】

特に、例えばリガンドを認識する標識抗体の添加によるよう、第2段階の検出を行う場合には、標識は適切な基質を添加した後に検出可能な産物シグナルを提供できる共有結合した酵素でありえる。結合体に使用できる適当な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼなどが含まれる。市販されていない場合には、そのような抗体-酵素結合体は、当技術分野で周知の技術によって、容易に作製できる。第2段階の結合試薬は、十分な特異性でリガンドと結合するため、他に存在する成分とは区別できる任意の化合物で良い。好ましい態様では、第2段階の結合試薬は、モノク

ローナルまたはポリクローナル血清のいずれかの、リガンド特異的抗体、例えば、マウス抗ヒト抗体などである。

#### 【0084】

シグナルの増加のために、リガンドをビオチン、ジゴキシゲニンなどの薬剤で標識することができ、このとき第2段階の試薬は、その標識に適合するアビジン、ストレプトアビジン、抗ジゴキシゲニン抗体などとなる。

#### 【0085】

リガンドの結合を検出するために、例えば、走査型レーザー顕微鏡、蛍光計、改良ELISAプレートリーダー等を用いて、マイクロアレイのスキャンを行うことができる。例えば、走査型レーザー顕微鏡で、使用した蛍光体ごとの適切な励起線を用いて、別々のスキャンができる。スキャンで得られたデジタル画像を組み合せて、その後の分析を行う。任意のアレイ要素について、1つの標識の蛍光シグナルの比を、他の標識DNAの蛍光シグナルと比較して、相対的な量を決定できる。

#### 【0086】

マイクロアレイとリガンド検出方法は、いくつかのスクリーニング、研究、および診断アッセイ法に使用できる。1つの用途では、研究または診断のために、抗体のアレイに生物体の総タンパク質を結合させ、タンパク質発現をモニターする。正常細胞の総タンパク質を1色の蛍光体で標識し、疾病細胞の総タンパク質を別の色の蛍光体で標識し、2つのサンプルを同時に同じアレイに結合させると、異なるタンパク質発現が、2つの蛍光体の強度の比として測定できる。この2色実験を用いて、異なる種類の組織、疾病状態、薬剤に対する応答、または環境因子に対する応答下での発現がモニターできる。

#### 【0087】

例えば1つもしくは複数のタンパク質が疾病経路に関与しているかどうか、または疾病特異的表現型と相関があるかを決定するためのスクリーニングアッセイ法では、培養細胞から測定できる。そのような細胞は、標的または対象となる経路に作用する薬学的に活性な薬剤を添加することによって、実験的に操作できる。この用途は、生物機能の解明または治療標的の発見に重要である。

**【0088】**

多くの診断または研究のためには、血液または血清中の、例えばタンパク質リガンドのようなリガンドのレベルを測定することが有用である。この用途は、特定の診断または予後と相関のある臨床的に有用なマーカーの発見および診断に重要である。例えば、平行して一連の抗体またはT細胞受容体の特異性をモニターすることによって、自己免疫疾患、感染、移植片拒絶の経過における抗体のレベルと動態を決定できる。または、正常および疾病の血液サンプルの比較、または疾病の異なる段階での臨床サンプルの比較によって、対象となる疾病に関連する新しいタンパク質マーカーが開発される可能性がある。

**【0089】**

本発明の別の態様では、ポリペプチドアレイを用いて、タンパク質の翻訳後修飾を検出できるが、これはシグナル伝達経路および細胞調節の研究に重要である。翻訳後修飾は、リン酸化、グリコシル化、ファルネシル化 (farnesylated) など、タンパク質の特定の状態に特異的な抗体を用いて検出できる。

**【0090】**

リガンドとポリペプチドの間のこれらの相互作用の検出は、医学的な診断につながる。例えば、既知の病原抗原に特異的な種々の抗体を含むアレイに、未知の病原体サンプルを結合させることによって、病原微生物が明確に同定できる。

**【0091】****実験**

本発明は、記述された特定の方法、プロトコール、細胞株、動物種または属、および試薬に限定されず、様々である。また、本明細書で使用される用語は、特定の態様を説明する目的のためのみのものであり、本発明の範囲を制限する意図はなく、本発明の範囲は添付する特許請求の範囲によってのみ限定されると理解する必要がある。

**【0092】**

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される単数形「1つの (a)」、「および (and)」および「その (the)」は、文脈が明らかにそうでないことを示す場合以外は、指示対象の複数形も含む。他に明らかに記載がないかぎり、本明

細書中のすべての専門的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通に理解されているものと同じ意味を持つ。

### 【0093】

以下の実施例は、本発明を実行し使用するための方法を当業者に完全に開示し説明するためのものであり、本発明と見なされるものの範囲を限定する意図を持つものではない。使用する数字（例えば、量、温度、濃度等）に関する正確性を保証する努力を行なったが、実験誤差および偏差を考慮する必要がある。特に記載されないかぎり、分量は重量での分量、分子量は平均分子量；温度は摂氏；および気圧は大気圧またはその付近である。

### 【0094】

#### 実施例1

##### 抗体および抗原マイクロアレイ

115の異なるリガンド/抗リガンド対を用いて、高度に制御された実験が実行できる1セットの抗体・抗原対が集められた。

### 【0095】

#### 方法

アレイの調製：抗体溶液は、グリセロールなしで、PBS/0.02%アジ化ナトリウム緩衝液中で、100～200 μg/mLに調製された。抗体はポリLリジンで処理されたガラススライド上にスポットされた。スライドは以下の手順で誘導化された。スライドをスライドラックに置き、ラックをチャンバーに入れる。280 mL ddH<sub>2</sub>O中に70 g NaOHを溶解し、420 mL 95%エタノールを添加して洗浄液を調製する。総容積は700 mL (= 2 X 350 mL) となる。完全に混合するまで攪拌する。スライドを入れたチャンバーに溶液を注ぐ；ガラスのフタでチャンバーを覆う。回転式シェーカーで2時間混合する。ddH<sub>2</sub>Oの満たされた新しいチャンバーに素早くラックを移す。ラックを上下して、よくすすぐ。毎回、新しいddH<sub>2</sub>Oを用いて、4回すぎを繰り返す。ポリリジン溶液を調製する：560 mLの水に70 mL ポリLリジン + 70 mL組織培養用PBS。スライドをポリリジン溶液に移し、15分～1時間振盪する。ddH<sub>2</sub>Oの満たされた新しいチャンバーにラックを移す。5回上下に振ってすすぐ。マイクロタイタープレートキャリア上でスライドを5分間500 rpmで遠心する

。45°Cのバキュームオーブンで10分間スライドラックを乾燥させる。

#### 【0096】

110の異なる抗体または抗原を各々少なくとも3ウェル含む384ウェルのマイクロタイタープレート中で、抗体と抗原が調製された。アレイヤー上の16チップのプリントヘッドが、プレートを3回スポットし、各抗体または抗原ごとに9~12の重複するスポットとして、合計1152スポットが作製された。スポット間の間隔は375マイクロメートルだった。アレイは密閉容器中に密封された。短期保存(~1ヶ月)なら4°Cで保存、それ以上の保存なら凍結保存できる。

#### 【0097】

スライドの裏にスポットの位置を描くように、ダイアモンドで刻みつける (diamond scribe) か、または消えないマーカーで印をつけた。結合しなかったタンパク質を除去するために、アレイをPBS/3%脱脂乳/0.1%Tween-20中に数回浸し、直ちにPBS/3%脱脂乳溶液に移し、4°Cで一晩ブロックした。脱脂乳溶液は、微粒子を除去するために、最初に遠心(10000 x gで10分)した。

#### 【0098】

ブロッキング後、結合しなかった乳タンパク質を除去するために、スライドを室温で1分ずつ3回連続して0.2 x PBSに浸し、振り動かして洗った。タンパク質混合物を添加するまで、アレイは最後の洗浄液に浸しておいた。

#### 【0099】

サンプル調製：タンパク質溶液は、色素溶液(下記参照)との混合後の最終タンパク質の濃度が0.2~2 mg/mLになるような濃度で、各アレイにつきタンパク質を最高~15 μgまで(各アレイ25 μL使用の時)使用して、pH 8.0の0.1炭酸またはリン酸緩衝液中で調製した。

#### 【0100】

NHS-エステルで活性化したCy色素(Amersham社、カタログ番号PA23001(Cy3)およびPA25001(Cy5))を0.1 M pH 8.0炭酸緩衝液中に溶解し、タンパク質溶液との混合後の色素の最終濃度が100~300 μMになるようにした。(色素の各バイアルには200 nmolが含まれている)。色素溶液とタンパク質溶液を混合し、室温で暗所で45分間反応させた。標準タンパク質溶液をCy3色素溶液と混合し、試験

タンパク質溶液をCy5色素溶液と混合した。少なくとも200倍の消光剤：色素濃度が得られるように、それぞれに十分量の1 M pH8トリスまたはグリシンを添加して反応を消滅させた。

### 【0101】

各反応液を、適当な分子量カットオフ値を持つマイクロ濃縮器にかけた。カットオフ値3000 Dで、色素を除去しつつ大部分のタンパク質が得られた。低分子量のタンパク質が重要でない場合は、カットオフ値10000 Dの方が速い。マイクロ濃縮器の使用方法にしたがって、反応液を遠心した。室温で $10000 \times g$ で遠心した場合、10000 Dなら通常20分、3000 Dなら80分かかる。遠心後、Cy5またはCy3標識タンパク質溶液のいずれかに3%の乳プロッカーを添加した。（微粒子を除去するために、乳はまず遠心する必要がある： $10000 \times g$ で10分間。）タンパク質溶液から作製する各アレイに $25 \mu L$ の乳を添加する。各マイクロコンに $500 \mu L$ になるようにPBSを添加して、再度遠心する。濃縮したサンプルは、乾燥および沈殿を防ぐため、少量（～ $5 \mu L$ ）のPBS中に採取した。

### 【0102】

Cy3標識標準タンパク質溶液は、適当なCy5標識試験タンパク質溶液に分配し、各混合液にPBSを添加して、各アレイ $25 \mu L$ になるようにした。微粒子または沈殿物は、1)  $0.45 \mu m$ スピンドルフィルターを通すか、または2)  $14000 \times g$ で10分間遠心して、上清をピペットで採取して除去した。

### 【0103】

検出：各アレイはPBS洗浄から、個々に取り出した。アレイが乾燥しないようにして、 $25 \mu L$ の色素標識タンパク質溶液をスポット上（記載された境界内）に載せ、タンパク質溶液上にカバースリップを載せた。カバースリップは、アレイの寸法よりも少なくとも1/4インチ長い。アレイの下にPBSの層を置き、アレイを密封した加湿チャンバーに入れ、4°Cで約2時間インキュベートした。各アレイをPBS中に軽く浸してタンパク質溶液とカバースリップを除去し、ただちにPBS/0.1%Tween-20溶液中のスライドラックに移した。全てのラックがPBS/Tween溶液に入ったら、室温で～20分間、回転式シェーカー上で洗った。アレイをPBS溶液中の新しいラックに移し（Tweenの残留を抑えるため）、5～10分間穏やかに揺ら

し、PBS、H<sub>2</sub>O、H<sub>2</sub>Oの洗浄溶液に移して、それぞれ5分間穏やかに揺らした。その後、アレイはスピンドライヤーで乾燥して、スキャンした。

#### 【0104】

分析：各スポットの蛍光強度は、その特定のタンパク質への結合レベルを反映している。異なる色素で標識したプールのタンパク質間の相対濃度は、各スポットのカラーチャネルの間の蛍光強度を比較して決定できる。以下の方法を使用して相対濃度が決定された。

#### 【0105】

アレイ上の各分析物スポットの位置は、アレイ上の各スポットの周りに境界をつけるジーンピックス (GenePix) またはスキャンアライズ (ScanAlyze) のような「グリッド」ソフトウェアを用いて描かれた。

#### 【0106】

各スポットの蛍光シグナルは、グリッドソフトウェアを用いて描かれた境界内での、ピクセル強度の平均値または中央値として決定された。各カラーチャネルは、別々に処理された。選択的に、各円内の不良ピクセル、すなわち平均ピクセル強度から有意に逸脱した強度を持つピクセルを棄却するために、統計的手法が使用された。

#### 【0107】

シグナルからバックグラウンドが差し引かれた。バックグラウンドは、1) 各スポットの周りの局所部分のピクセル強度の中央値もしくは平均値、または 2) 非結合バックグラウンド領域と判断される特定のスポットもしくは領域内のピクセル強度の中央値もしくは平均値として、決定できる。バックグラウンドの不良ピクセルを棄却するために、統計的手法を使用することができる。

#### 【0108】

各スポットでの、別々に標識されたプールのタンパク質間の相対的結合は2つのカラーチャネルの蛍光強度の比に相当する。この比が真の相対濃度を反映するためには、カラーチャネルの1つのバックグラウンドを差し引いたシグナルに、標準化係数を掛け合わせる必要がある。標準化係数は、真の濃度が既知のスポットを選択し、真のカラー比を最も正確に与える係数を計算することによって、決

定できる。または、対照スポットが使用されない場合は、アレイ上の全てのスポットへの平均結合は、2つのタンパク質プールについてほぼ等しいと仮定することもできる。そして、アレイ上の全てのスポットに関して、平均のカラー比を与える標準化係数が計算される。

### 【0109】

全てのアレイが標準化され、カラー比が計算されると、アレイ同士の間のタンパク質濃度の変化が比較される。各実験に同一の標準プールが使用されれば、解釈は最も簡単になる。

### 【0110】

#### 結果

タンパク質アレイの特異性、定量、および検出限界を調べるために、混合液間で各タンパク質濃度が独自に異なる抗原の6種類の混合液が作製された。例えば、1つのタンパク質は高濃度から低濃度へ変化し、別のタンパク質は低濃度から高濃度、さらに別のタンパク質は低濃度から高濃度さらに低濃度と変化した。セット全体では、濃度は3桁変化していた。この6つの混合液のセットを、種々の濃度と種々のレベルのウシ胎児血清(FCS)バックグラウンドで検出した。データから実際の濃度変化を再構成する能力は、マイクロアレイの性能レベルを示していた。

### 【0111】

各抗体について6～9の重複するスポットを含むマイクロアレイが作製された。図5は、6つの異なるタンパク質混合液（赤い蛍光色素Cy5で標識）から作製されたこれらの一連のアレイを、各タンパク質を等しい量含む標準混合液（緑色の蛍光色素Cy3で標識）と比較したものである。アレイの各スポットにつき、赤/緑の比率が計算され、希釀の関数としてプロットされた。図6は8つの抗原に関して、希釀に対する赤と緑の比(R/G)の対数をプロットしたものである。タンパク質の濃度比の対数として計算される理想的な傾きは、1.5から-1.5に低下する直線として示されている。グラフ上の他の線はアレイ上の重複するスポットを表す。この実験データの傾きは、調べた6つの濃度に渡って理想的な傾きと非常に類似しており、これらの抗体は関係する抗原を特異的かつ定量的に検出することを示

す。理想的な傾きからの逸脱は、重複するスポットの間で体系的に起きており、これは定量における最大の誤差は、システム中のランダムな変動よりも、むしろピペッティングまたはデータの換算で起きることを示唆している。

### 【0112】

特異的なタンパク質の検出は、濃度のみではなく、バックグラウンドのタンパク質濃度によっても制限される。タンパク質のバックグラウンドが高い場合に、特異的タンパク質がどの程度検出できるかを決定するため、色素ラベル前に、異なるタンパク質混合液のセットが種々の量のFCSに添加された。抗原混合液の濃度の10倍および100倍の濃度のFCSが使用された。図7は、タンパク質であるIgGおよびフラッグの定量におけるタンパク質バックグラウンドの効果を示す。血清のバックグラウンドがない場合は、いずれのタンパク質についても、120 ng/mLから120 pg/mLの濃度範囲全体に渡って、正確な定量が観察された。10xの血清濃度では、フラッグタンパク質はまだ正確な定量を示しているが、IgGは上限と下限で理想的な傾きからわずかに逸脱している。100xの血清濃度では、いずれのタンパク質も理想的な傾きから著しい逸脱を示す。100x血清の実験では、部分濃度（抗原濃度を総タンパク質濃度で割ったもの）は $4 \times 10^{-5}$ から $4 \times 10^{-8}$ の範囲だった。したがって、これらの抗体を使ったときの部分濃度の検出限界は、フラッグでは $\sim 2 \times 10^{-6}$ 、IgGでは $\sim 2 \times 10^{-7}$ だった。これらの部分濃度は、多くの臨床的に興味深い血清タンパク質の生理的範囲である。調べた各抗原に関するこの種の分析の結果は、以下の表に示されている。バックグラウンドの低い全ての実験の全濃度範囲およびバックグラウンドの高い試験の少なくとも一部における正確な定量の存在で、抗体は分類されている(++)。低いバックグラウンドの実験の大部分について正確な定量が示された場合、(+)と分類されている。抗体の多くは、シグナルがないか、または非特異的なシグナルのいずれかを示した。

### 【0113】

第2の検出方式では、抗原をアレイ上にスポットして、標識抗体を検出した。図7は、4つの異なる混合液中の抗体の特異的検出の例である。特異的な抗原/抗体の結合の同定を可能にする組み合せ標識方式が使用された。上述と類似した分析が行われ、マイクロアレイ上の抗原の結合特異性が分類された。この分析結果

は、抗体アレイの結果とともに以下の表に示されている。この分析によると、抗原をスポットしたタンパク質アレイは、抗体をスポットしたタンパク質アレイと比較して、少なくとも同程度またはそれ以上にうまく働く。

【0114】

抗体/抗原	抗体アレイ			部分濃度リミット	抗原アレイ		
	++	+	-		++	+	-
抗 AIM-1	x			1.00E-06	x		
抗 HCG	x				x		
抗 MAP4	x				x		
抗 Per2	x				x		
抗 Flag (新)	x					x	
抗 Alpha HCG	x			4.00E-08		x	
抗 Fc. IgG	x			1.00E-07		x	
抗 Flag (旧)	x						x
抗ヒト IgG	x						x
抗 Mint2	x					x	
抗 Sin	x					x	
抗 SOD	x					x	
抗 ABR		x		6.00E-05	x		
抗 AKAP-KL		x			x		
抗デマチン(Anti-Dematin)		x		1.00E-04	x		
抗 Dlg		x			x		
抗 DSIF		x			x		
抗 FIN13		x			x		
抗 HDAC3		x			x		
抗 HIF-1 $\alpha$		x			x		
抗 ICH-IL		x			x		
抗 IGF2R		x			x		
抗カナダプチン (Anti-Kanadaptin)		x			x		
抗 La		x			x		
抗 LAIR-1		x			x		
抗 LAP2		x			x		
抗 MEKK3		x			x		
抗 Mint1		x			x		
抗 MST3		x			x		
抗 p19 Skp1		x			x		
抗 p38 $\gamma$		x			x		
抗 Rab4		x			x		
抗 TEF-1		x			x		
抗 ZO-1		x			x		

抗トロポミオシン	x			x	
抗アルカリフォスファターゼ	x			x	
抗 cTnI	x		4.00E-04	x	
抗 DFF45	x			x	
抗フィプロネクチン	x			x	
抗 GOK	x			x	x
抗 GS15	x			x	x
抗インシュリン	x			x	x
抗 LAT	x			x	x
抗 MAD-3	x			x	x
抗 mGluR1	x			x	x
抗 MST1	x			x	x
抗ミオグロビン (ResGen)	x			x	x
抗ミオグロビン(Sigma)	x			x	x
抗ニューログリカンC	x			x	x
抗 PSA 2F5	x			x	x
抗 PSA F5	x			x	x
抗 Rad50	x			x	x
抗 RBC	x			x	x
抗 Rim	x			x	x
抗 ROCK-1	x			x	x
抗 SRPK1	x			x	x
抗 VLA-3 $\alpha$	x			x	x
抗アダプチン $\alpha$		x		x	x
抗 Bax		x		x	x
抗カルレチニン		x		x	x
抗 c-Cbl		x		x	x
抗クラスリンH		x		x	x
抗 DEK		x		x	x
抗 DGK $\delta$		x		x	x
抗 Efp		x		x	x
抗 erg2		x		x	x
抗 hHR23B		x		x	x
抗カリニンB1		x		x	x
抗 PUNTS		x		x	x

抗 RNCAM		X	X	X		
抗 SRP54		X	X	X		
抗 TFI-I		X	X	X		
抗 TIF2		X	X	X		
抗 TSP-1		X	X	X		
抗 VHR		X	X	X	X	
抗 AKAP149		X	X	X	X	
抗 $\alpha$ 酸性糖タンパク質 (AGP)		X	X	X	X	X
抗アネキシンII		X	X	X	X	X
抗 ARNT1		X	X	X	X	X
抗 Brn		X	X	X	X	X
抗カルモジュリン		X	X	X	X	X
抗カルネキシン		X	X	X	X	X
抗 CaM K IV		X	X	X	X	X
抗 CAS		X	X	X	X	X
抗 CLA-1		X	X	X	X	X
抗 CRP		X	X	X	X	X
抗サイクリンA		X	X	X	X	X
抗 DNA pol $\delta$		X	X	X	X	X
抗 eIF-5		X	X	X	X	X
抗 ERp72		X	X	X	X	X
抗 ESA		X	X	X	X	X
抗 G3VP		X	X	X	X	X
抗ゲルソリン		X	X	X	X	X
抗 Hsp70		X	X	X	X	X
抗 Hsp90		X	X	X	X	X
抗 IAK-1		X	X	X	X	X
抗 IQGAP1		X	X	X	X	X
抗 KAP3A		X	X	X	X	X
抗 KI-67		X	X	X	X	X
抗 LRP		X	X	X	X	X
抗 MEK5		X	X	X	X	X
抗ニューラビン (Anti-Neurabin)		X	X	X	X	X
抗 Numb		X	X	X	X	X
抗 PARP		X	X	X	X	X

抗 Pax-5			x				x	x
抗 PDI			x					
抗 PI3-K p170			x				x	
抗 rSec8			x				x	
抗 SIRP $\alpha$ 1			x					x
抗 Smad4			x					x
抗 TAF-172			x					x
抗 TiAR			x			x		
抗トランスポーチン (Anti-Transpotin)			x					x
抗ウトロフィン(Utrophin)			x					x

## 【0115】

上述の実験データおよび説明から、本方法は、固定化ポリペプチドを含むマイクロアレイの作製のための有用な方法を提供することは明らかである。ポリペプチドは結合特異性を保持し、タンパク質およびその断片を含むポリペプチド、ペプチド、核酸、因子およびコファクター等に結合するリガンドの検出と定量に有用である。

## 【0116】

本明細書に引用するすべての論文および特許出願は、各々の論文または特許出願が明確に個々に参照として本明細書に組み入れられると記されているように、参考として本明細書に組み入れられる。

## 【0117】

前述の発明は、明確な理解のために、図面や実施例によって詳細に記載されているが、本発明の開示に照らして添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱せずに、特定の変更および修正を加えることは当業者には明らかであると思われる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の1つの態様で使用するために作製された開いた毛細管の分配ヘッドを持つ試薬分配装置の側面図である。

【図2A～2C】 本発明の方法の1つの態様に記載される、図1の分配ヘッドを用いて疎水性表面に固定量の小滴を送達する段階を示す。

【図3】 本発明の方法にしたがって作製された分析物アッセイ領域の2次

元アレイの一部を示す。

**【図4】** 本発明に記載されるアレイを作製する自動装置の部品を示す二次元図である。

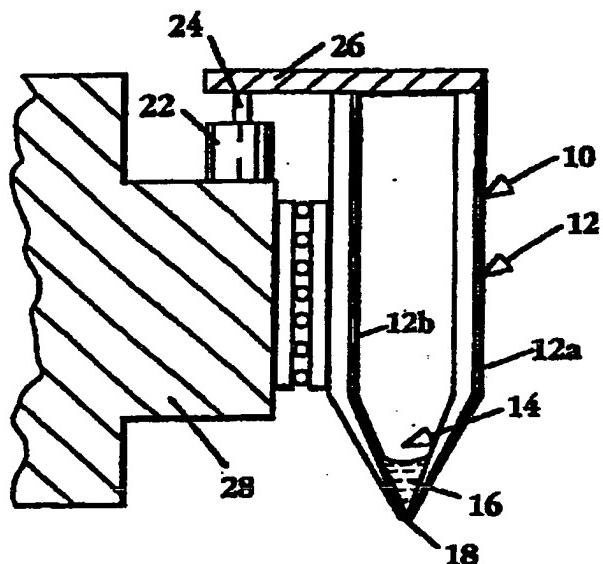
**【図5】** 110の抗原のマイクロアレイにおける濃度プロファイルを示す。

**【図6】** タンパク質サンプルの希釈に対する2つの蛍光色素からのシグナルの比率としてのタンパク質の検出を示す。

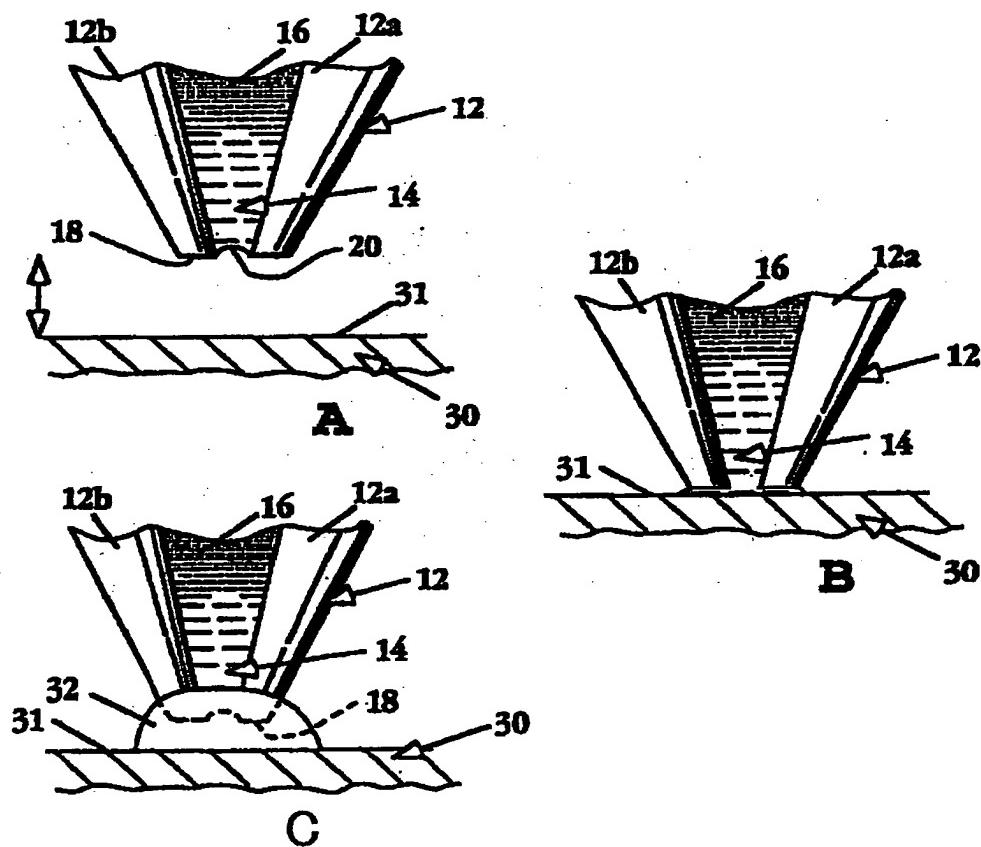
**【図7】** 血清希釈後のタンパク質の定量グラフを示す。

**【図8】** 複数の抗体の組み合せ検出を示す。

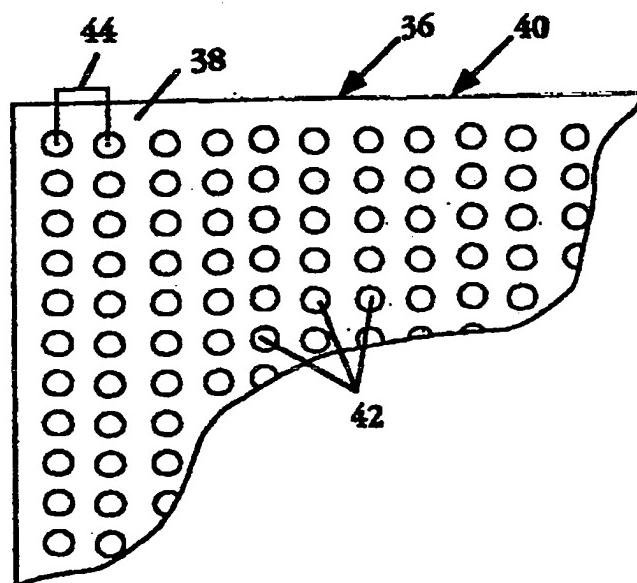
**【図1】**



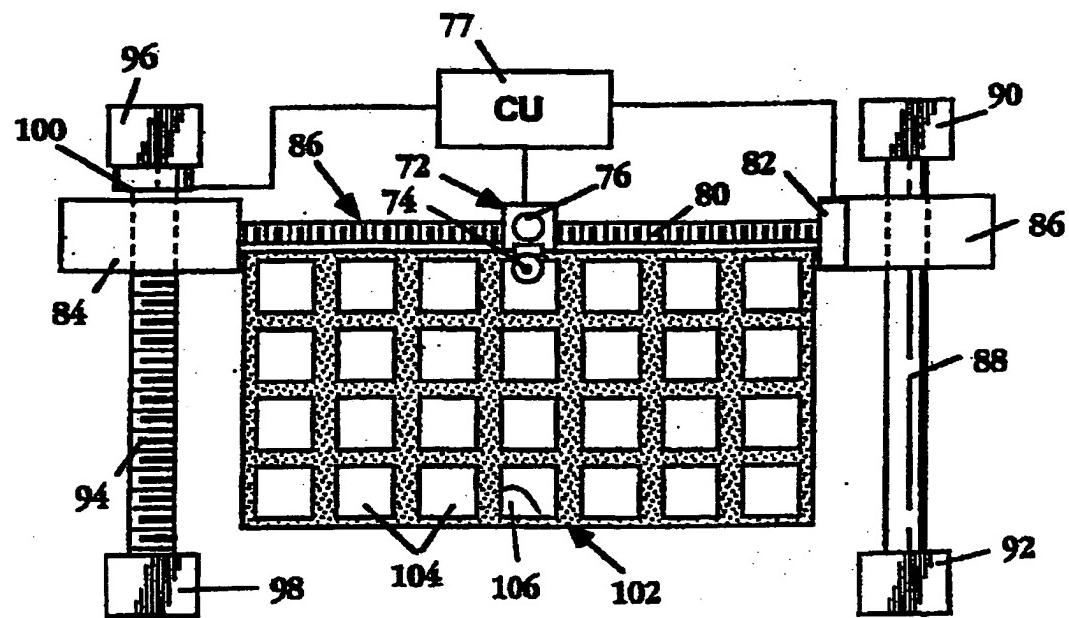
【図2】



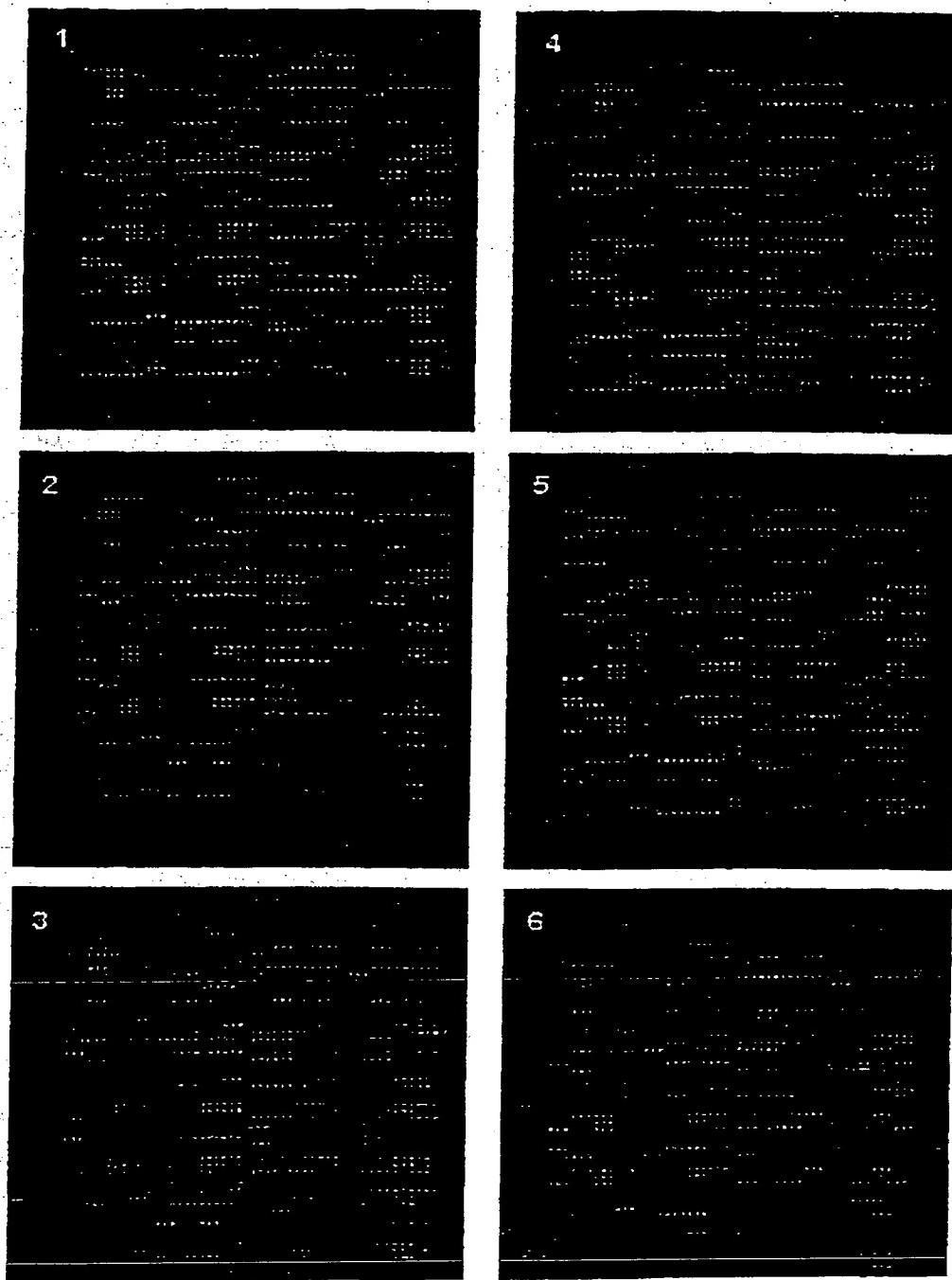
【図3】



【図4】

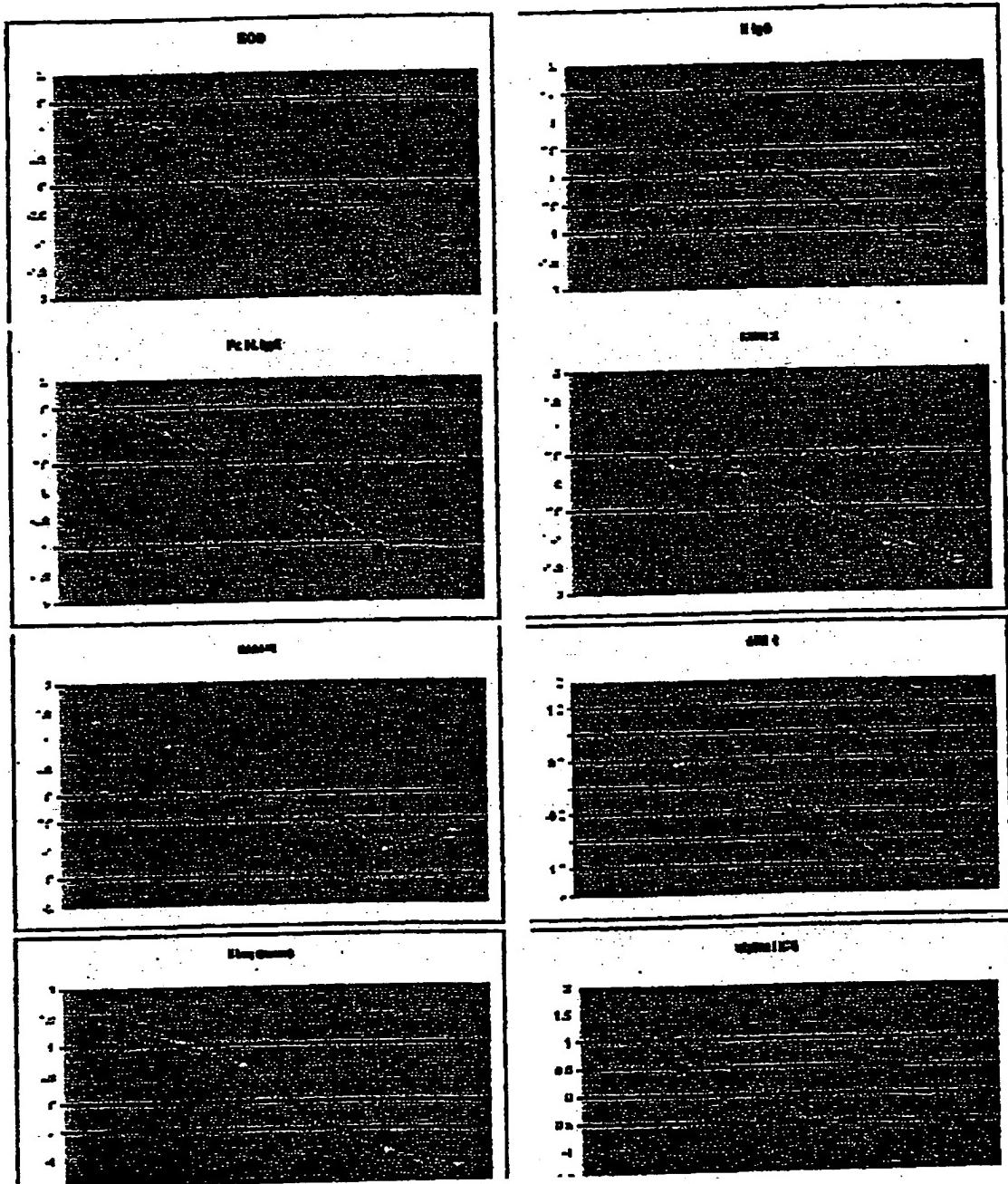


【図5】

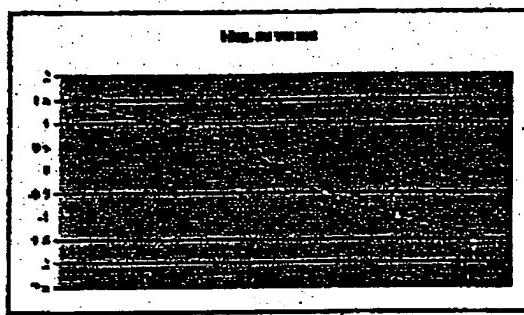
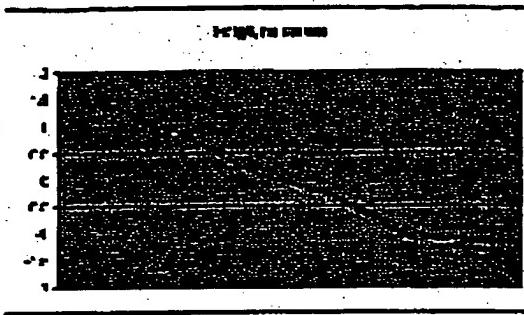


BEST AVAILABLE COPY

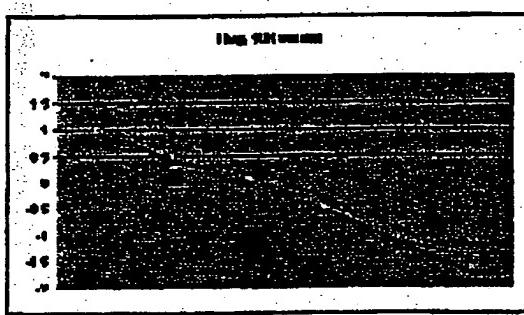
【図6】



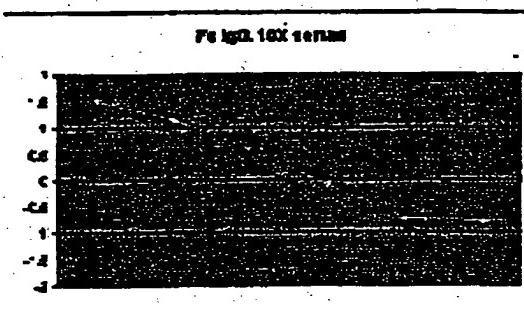
【図7】

**Fc h. IgG****フラッグ**

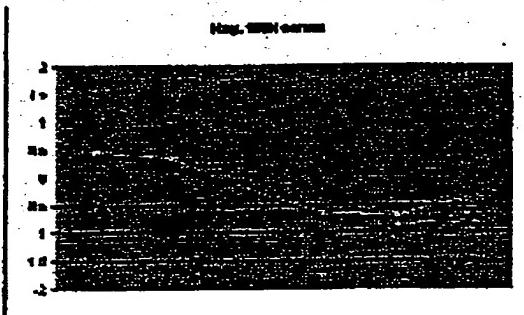
IgG 100kV scale



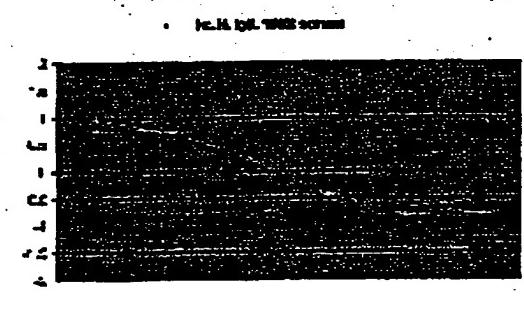
Fc IgG 100kV scale



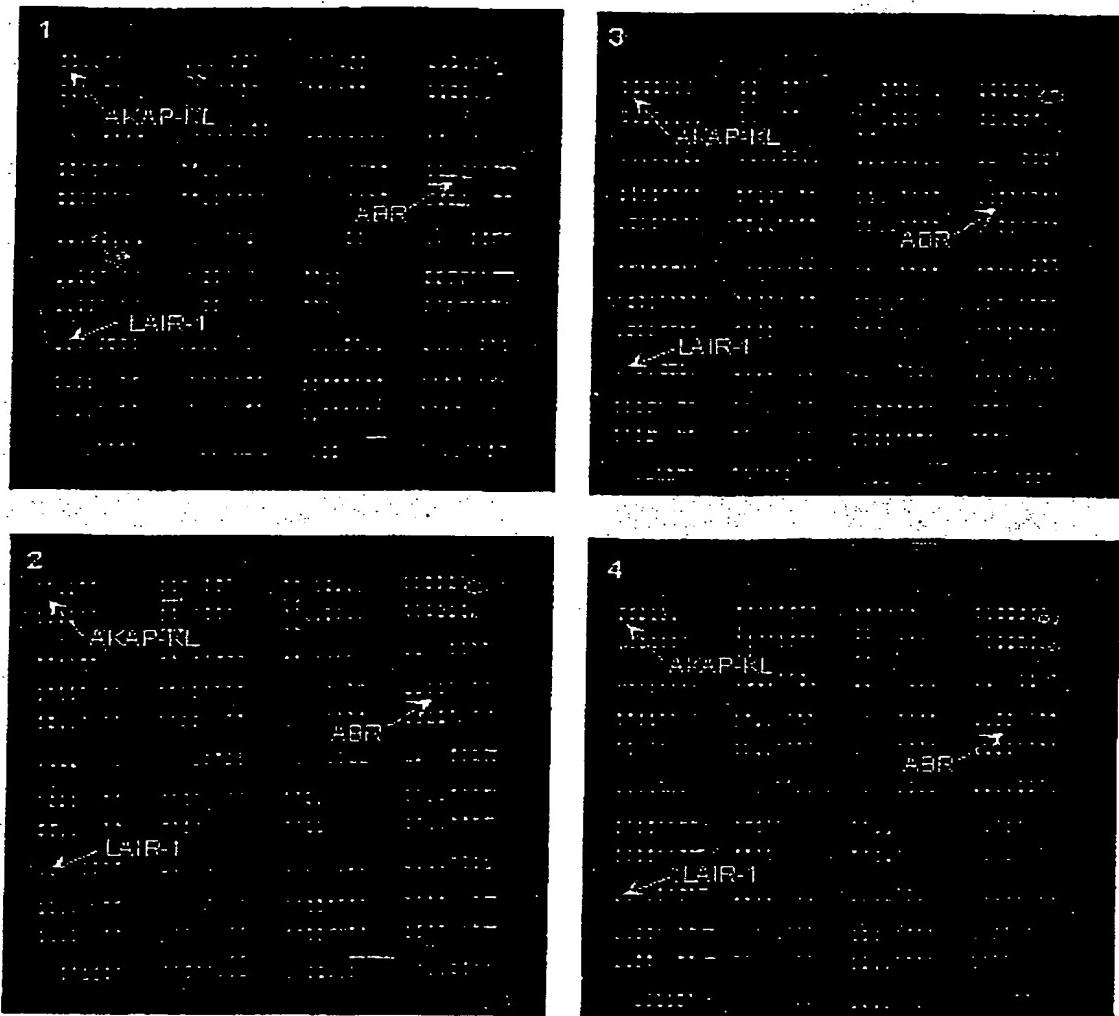
IgG 100kV scale



Fc h. IgG 100kV scale



【図8】



混合物 1

**AKAP-KL****1****LAIR-1****2****ABR****3**

混合物 2

**2****3****1**

混合物 3

**3****2****2**

混合物 4

**2****3****1**

0 = ブランク

1 = 緑

2 = 赤

3 = 黄

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In National Application No PCT/US 00/10171
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 B01J19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N B01J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 807 522 A (PATRICK O. BROWN & TIDHAR DARI SHALON) 15 September 1998 (1998-09-15) column 3, line 23 - line 35 column 4, line 17 - line 23 column 6, line 32 - line 37 column 14, line 19 - line 34 column 15, line 5 - line 58	1-12
X	WO 97 42507 A (ISIS INNOVATION LIMITED) 13 November 1997 (1997-11-13) abstract page 3, line 15 -page 4, line 16 page 7, line 18 - line 25 page 9, line 14 -page 10, line 3 page 4, line 14 - line 26	1-12 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'E' earlier document but published on or after the international filing date		
'L' document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
11 October 2000	18/10/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 8000 Patentkantoor 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Stevnsborg, N	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No.  
PCT/US 00/10171

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 324 633 A (STEPHEN P.A. FODOR & LAURA T. MAZZOLA) 28 June 1994 (1994-06-28) abstract column 3, line 47 - line 60 column 5, line 21 - line 38 column 6, line 3 - line 61 column 10, line 21 -column 11, line 17	1-12
X	JEFFREY W. JACOBS & STEPHEN P.A. FODOR: "COMBINATORIAL CHEMISTRY - APPLICATIONS OF LIGHT-DIRECTED CHEMICAL SYNTHESIS" TIBTECH, vol. 12, no. 1, 1994, pages 19-26, XP000652268 CAMBRIDGE, UK the whole document	1-12
X	STEPHEN P.A. FODOR ET AL.: "LIGHT-DIRECTED, SPATIALLY ADDRESSABLE PARALLEL CHEMICAL SYNTHESIS" SCIENCE, vol. 251, no. 4995, 15 February 1991 (1991-02-15), pages 767-773, XP000486899 US ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	1-12
X	S. M. RUBER ET AL.: "LIGHT-DIRECTED COMBINATORIAL PEPTIDE SYNTHESIS" 1992 , PROCEEDINGS OF THE 12TH AMERICAN PEPTIDE SYMPOSIUM, 16-21 JUNE 1991, CAMBRIDGE, MA, USA , LEIDEN, NL XP000371924 185690 page 489 -page 491	1-12
X	RONALD FRANK : "SPOT-SYNTHESIS: AN EASY TECHNIQUE FOR THE POSITIONALLY ADDRESSABLE, PARALLEL CHEMICAL SYNTHESIS ON A MEMBRANE SUPPORT" TETRAHEDRON, vol. 48, no. 42, 16 October 1992 (1992-10-16), pages 9217-9232, XP000353580 UK ISSN: 0040-4020 page 9217 -page 9232	1-12
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No. PCT/US 00/10171
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHRISTOPHER P. HOLMES ET AL.: "THE USE OF LIGHT-DIRECTED COMBINATORIAL PEPTIDE SYNTHESIS IN EPITOPE MAPPING" BIOPOLYMERS (PEPTIDE SCIENCE), vol. 37, no. 3, 1995, pages 199-211, XP000654595 NEW YORK, US ISSN: 0006-3525 Page 199 -page 211</p>	1-12
I		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No.
PCT/US 00/10171

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5807522 A	15-09-1998	AT 180570 T AU 709276 B AU 2862995 A CA 2192095 A DE 69509925 D DE 69509925 T EP 0804731 A EP 0913485 A ES 2134481 T GR 3030430 T JP 10503841 T US 6110426 A WO 9535505 A	15-06-1999 26-08-1999 15-01-1996 28-12-1995 01-07-1999 09-12-1999 05-11-1997 06-05-1999 01-10-1999 30-09-1999 07-04-1998 29-08-2000 28-12-1995
WO 9742507 A	13-11-1997	NONE	
US 5324633 A	28-06-1994	NONE	

---

フロントページの続き

- (72) 発明者 ブラウン パトリック  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 スタ  
ンフォード ピーター コウツ サーク  
ル 76
- (72) 発明者 ハーブ プライアン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 バー  
クレー グラント #1 1922